

# Establecimiento in vitro y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) D.C.

Fecha de recepción: 19/07/2010

Fecha de aceptación: 20/07/2010

Silvana Alvarenga Venutolo<sup>1</sup>

## Palabras clave

*Uncaria tomentosa*, uña de gato, cultivo de tejidos, germinación in vitro, aclimatización.

## Resumen

La *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C., (uña de gato) es una liana del bosque tropical, que se distribuye en forma natural en la zona Atlántica de Costa Rica, a alturas menores de 600 msnm. La infusión de la corteza de la raíz forma parte del acervo de la medicina tradicional de Costa Rica para aliviar diversas dolencias, como son: la gastritis, la artritis; además, funciona como fortificante del sistema inmunológico y, recientemente, para tratar el cáncer y el VIH. El cultivo in vitro se desarrolló como una herramienta para la micropropagación de plantas en la zona de Guápiles (Pococí), como estrategia de conservación para la explotación comercial sostenible de la especie. En este artículo se describen los protocolos para el

establecimiento y la micropropagación a partir de microestacas, en un medio M & S (1962) con 2 mg/L de BA, 3% de sacarosa y 7 g/L de agar; así como la germinación in vitro en el mismo medio M & S (1962) *semi sólido* (1,8 g/L de Phyta-Gel). Se probó el cultivo en medio líquido, en jarras fermentadoras y en sistemas de inmersión temporal automatizado (RITA®), y fue efectivo el método de inmersión cada tres horas, durante tres minutos. Se describe el proceso de aclimatación, el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

## Key words

*Uncaria tomentosa*, cat's claw, tissue culture, in vitro germination, acclimatization.

## Abstract

*Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C., (cat's claw), is a rainforest wood vine, distributed naturally in the Atlantic

1. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Apdo 159-7050. Correo electrónico: [salvarenga@itcr.ac.cr](mailto:salvarenga@itcr.ac.cr)

Las propiedades medicinales de esta especie se atribuyen a la presencia de tetra y penta alcaloides oxidoles, triterpenoides glicósidos esteroides y flavonoides (Pereira et al., 2008).

area of Costa Rica, at 6000 above the level of the sea. In Costa Rica, aqueous infusions made of root bark, are part of the traditional medicine recommendations for relieving ailments like gastritis and arthritis. Those extracts also have immune system strengthening properties and they have been recently reported as useful for cancer and HIV treatment. *In vitro* plant culture was developed as a tool for the micropropagation of plants in Guápiles (Pococí), as a strategy for sustainable commercial exploitation of species conservation. This article describes the protocols for the establishment and the micropropagation of axillary shoots in a M & S (1962) media with 2 mg/L BA, 3% sucrose and 7 g/L of Agar. As well as *in vitro* germination in the same semi solid propagation medium (1,8 g/L of Phyta-gel). The liquid culture was probed in jar fermentors and in Recipient for Automated Temporary Immersion system (RITA®). The best results were obtained with the immersion method, at a frequency of three minutes every three hours. This article describes the acclimatization process, growth and development of the vitroplants.

## Introducción

Las plantas son la fuente de un gran número de compuestos químicos valiosos, muchos de difícil síntesis por la vía química. Por esta razón, es que, a pesar de los avances en la síntesis orgánica, las plantas siguen siendo la fuente principal de algunos compuestos químicos de valor farmacéutico (Verpoorte y Hoopen, 2006).

La *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C, conocida como uña de gato, rangayo o bejuco de agua, es una liana tropical propia del bosque tropical lluvioso, se distribuye de forma natural desde Perú hasta Belice. Pertenece a la familia *Rubiaceae* taxa, caracterizada por la producción de diferentes metabolitos secundarios, empleados como fuente

del café, la quinina, tintes, colorantes y otros. En la medicina tradicional de Perú, los indígenas Asháninka, así como otras etnias del sur y del centro de América emplean la corteza de la raíz de la uña de gato, principalmente por sus efectos como antiinflamatorio (Keplinger et al.; 1998;) y contraceptivo; actualmente, se utiliza en el tratamiento de la artritis, la gastritis y el cáncer (Obregón, 1997; Pereira et al., 2008).

Las propiedades medicinales de esta especie se atribuyen a la presencia de tetra y penta alcaloides oxidoles, triterpenoides glicósidos esteroides y flavonoides (Pereira et al., 2008). La actividad citotóxica e inmuno estimulante se asigna a los oxi-indol alcaloides pentacíclicos. Existe un gran número de patentes inscritas en Estados Unidos y Europa que describen el efecto de los oxi-indol alcaloides como estimulantes del sistema inmunológico (Keplinger et al., 1989), o métodos de preparación de extractos que actúan como antiinflamatorios y antitumorosos (Pero, 2001; Bobrowski, 2004).

Debido a los descubrimientos de la actividad biológica de *Uncaria tomentosa*, existe alta demanda comercial de los extractos y otros productos derivados de esta especie, que se comercializan en más de 30 países fuera de Perú, en diferentes presentaciones como té, tabletas o cápsulas (de Jong et al., 1999). Costa Rica no es la excepción; a corto plazo, la fuerte demanda comercial de esta especie podría incrementar las tasas de extracción del recurso en los países en los que se distribuye en forma natural (Verpoorte y Hoopen, 2006).

El cultivo *in vitro* ofrece una serie de posibilidades y ventajas no solo para la micropropagación y conservación de plantas de interés (George, 2008). Estas técnicas constituyen una valiosa herramienta para el establecimiento de sistemas de células en suspensión, con posibilidad de incrementar el rendimiento de los principios activos presentes en

Los ensayos fueron efectuados en el Centro de investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en Cartago. El material vegetal empleado provenía de Guápiles, Pococí, provincia de Limón, zona Atlántica de Costa Rica.

las plantas y controlar su producción (Verpoorte y Hoopen, 2006).

Con el fin de conservar las poblaciones naturales y promover el uso sostenible del recurso, el Instituto Tecnológico de Costa Rica ha liderado, por más de diez años, el estudio de la fenología, la domesticación, detección y cuantificación de cuatro oxindol alcaloides y el aprovechamiento comercial de esta especie en comunidades rurales de la zona atlántica del país (Alvarenga *et ál.*, 2005; Alvarenga *et ál.*, 2008).

Este trabajo aporta los protocolos de establecimiento, micropropagación y germinación *in vitro*, con el objetivo de promover la propagación masiva de la especie como instrumento para la regeneración de poblaciones. Se detallan los protocolos que han mostrado resultados positivos a lo largo de varios años de investigación, por lo que el artículo no pretende comparar todos los tratamientos contemplados en el proceso de selección.

## Metodología

Los ensayos fueron efectuados en el Centro de investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en Cartago. El material vegetal empleado provenía de Guápiles, Pococí, provincia de Limón, zona Atlántica de Costa Rica.

### Establecimiento *in vitro*

#### Desinfección

Se seleccionaron yemas axilares de plantas de *Uncaria tomentosa*, localizadas en fincas de agricultores y bosques de la zona de Guápiles de Pococí, provincia de Limón, Costa Rica. Los explantes fueron lavados con jabón líquido; se sometieron al tratamiento de desinfección con Agri-mycín y Benlate (1:1) por 1 hora y se colocaron en una solución de cloruro de calcio  $\text{Ca}(\text{OCl}_2)_2$  al 10% (p/v), durante 15 minutos. Luego, fueron sumergidos

en alcohol de 70°, por 1 minuto. Se inocularon durante 24 horas, en medio líquido Murashige & Skoog (M & S) (1962) al 25% y 1ml/L PPM™® (Plant Preservative Mixture). Posteriormente, las yemas fueron sembradas con las sales inorgánicas M & S (1962), las cuales contenían un 3% de sacarosa, 7g/L de agar y 0,5ml/L de PPM™®. Se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura promedio de  $27 \pm 2$  °C, 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica y un fotoperíodo de 16 horas.

Se determinó el porcentaje de contaminación y de sobrevivencia.

### Germinación de semillas *in vitro*

Los frutos se colectaron en bosques de la zona de Guápiles de Pococí; se lavaron con agua y jabón líquido; se colocaron en una mezcla de Agri-mycín (1g/L) y Benlate (1g/L), durante 30 minutos; luego, fueron trasladados a la cámara de flujo laminar. Se sumergieron en una solución con 75% de ácido láctico (v/v) y 25% de alcohol etílico a 70° durante 15 minutos. El último lavado fue realizado en una solución con 40 mg/L de gentamicina, previamente filtrada.

Posteriormente, los frutos fueron transferidos a la cámara de flujo laminar, donde se lavaron con agua estéril tres veces consecutivas. Los frutos en cajas de Petri se expusieron durante media hora al aire generado por la cámara de flujo laminar; posteriormente, se abrieron, liberando las semillas. Con un asa odontológica, se inocularon en el medio de cultivo con las sales M & S (1962), 2 mg/L de bencil adenina (BA), 3% de sacarosa, 1,8g/L de Phyta-Gel y un pH regulado a 5,6. Se determinaron los porcentajes de contaminación y de germinación *in vitro*. Los frutos fueron colocados en una cámara de crecimiento a luz difusa y a una temperatura promedio de  $27 \pm 2$  °C.

## Micropropagación

Se subcultivaron microestacas con y sin hojas y yemas, en el medio de cultivo M & S (1962), complementado con 10 mg/L de bencil adenina (BA), 25 mg/L de cisteína, 3% de sacarosa, 7 g/L de agar; el pH del medio se reguló a 5,6 y se determinó la tasa de multiplicación promedio. Posteriormente, al mes de inoculados, los explantes con brotes fueron subcultivados en el medio citado anteriormente, pero se disminuyó la concentración de BA a 2 mg/L. La micropropagación se realizó usando como explantes microestacas de dos nudos, inoculadas en un medio de cultivo M & S (1962) con 2 mg/L de BA, 3% de sacarosa y 7g/L de agar. Dichos explantes fueron colocados en una cámara de crecimiento, a una temperatura promedio de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica y un fotoperíodo de 16 horas.

## Micropropagación en medio de cultivo líquido

Se inocularon 100 explantes (brotes), provenientes de semillas germinadas, en medio líquido, en una jarra fermentadora de 5 L con 1 L de medio de cultivo de micropropagación (M & S (1962) con 2 mg/L de BA, 3% de sacarosa. Se evaluó el aspecto de las vitroplantas y su crecimiento y se determinó el número de brotes regenerados por planta.

Se realizaron ensayos en el sistema de inmersión temporal (RITA)®; se sembraron 30 microestacas por RITA, con 250 mL del medio de cultivo líquido de micropropagación citado. La inmersión fue programada cada tres horas, con una duración de tres minutos. Las microestacas fueron colocadas en una cámara de crecimiento, a una temperatura promedio de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica y un fotoperíodo de 16 horas. Se evaluó el crecimiento y desarrollo de las vitroplantas.

A las tres semanas del cultivo, se cambió el medio de cultivo de micropropagación por el de enraizamiento con el 50% de las sales M & S (1962), vitaminas de Morel (1958), complementado con 2 mg/L de ácido indol butírico (AIB), 10 g/L de sacarosa.

Se evaluó el aspecto y desarrollo de las vitroplantas, así como el porcentaje de vitroplantas enraizadas. Posteriormente, este material se empleó en ensayos de aclimatación.

## Enraizamiento y aclimatación de vitroplantas

Una vez que las vitroplantas micropropagadas en el medio con las sales M & S (1962), complementado con 2 mg/L de BA, 3% de sacarosa y 7 g/L de agar, superaron los 10 cm de altura, fueron transferidos a un medio de cultivo con el 50% de las sales, M & S (1962), vitaminas de Morel (1958), complementado con 2mg/L de ácido indol butírico (AIB), 10 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar. Se colocaron en una cámara de crecimiento a una temperatura promedio de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica y un fotoperíodo de 16 horas.

Las plantas propagadas en el sistema de inmersión temporal (RITA), en diferentes estadios de desarrollo, fueron transferidas a bandejas plásticas para almácigo, preparadas con una capa de tierra con granza esterilizada. Las bandejas se colocaron en un frasco de vidrio de 1 galón de capacidad, con una capa de 5 cm de agua. A los dos días del cultivo, se le quitó la tapa al frasco por períodos de una hora al día; posteriormente, se incrementó el tiempo de exposición al aire a 12 horas, durante la noche. Las plantas se mantuvieron en el frasco durante 45 días. Se trasladó el frasco a Las Colinas de Guápiles. Las plantas se sembraron, primero, en bolsas plásticas; se colocaron bajo sarán, por períodos de una a dos semanas. Cuando alcanzaron una altura

adecuada (aproximadamente 40 cm) fueron trasladados a campo. Se determinó el porcentaje de sobrevivencia.

## Resultados y discusión

### Establecimiento in vitro

Los explantes introducidos para la propagación clonal, recolectados en el campo, tuvieron un alto porcentaje de contaminación y baja sobrevivencia.

Los resultados preliminares no ofrecieron un protocolo que garantizara la efectividad del establecimiento in vitro. Por esta razón, se decidió probar con un agente de amplio espectro, el Plant Preserve Mixture (PPM™). Este compuesto fue aplicado al final del proceso de desinfección, en un medio de cultivo líquido con el 25% de las sales M & S (1962), sin sacarosa.

Los resultados obtenidos mostraron que con una concentración de 1 ml/L de PPM™ durante 24 horas en la desinfección y la inoculación de las yemas, en un medio con 0,5ml/L de PPM™, se obtuvo 0% de contaminación y un 12% de sobrevivencia.

El producto PPM™ es un biocida de amplio espectro que mata bacterias y hongos, y previene la germinación de las esporas. Se informa que actúa inhibiendo la actividad enzimática de algunas enzimas involucradas en el ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones de los organismos causantes de la contaminación (Guri, 2000).

### Germinación de semillas in vitro

El tratamiento de desinfección de frutos e inoculación de semillas de *U. tomentosa* produjo un 23% de contaminación, principalmente causada por la presencia de hongos. El porcentaje de germinación fue menor al 20%, y osciló entre el 13 y el 19,8%; fue ligeramente mayor cuando los ensayos se realizaron exponiendo las semillas a la luz; por esta razón, los ensayos

se realizaron exponiendo las semillas a la luz directa de la cámara de crecimiento y con una temperatura promedio de  $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ . La germinación in vitro de más de 20 accesiones de semillas provenientes de la zona de Guápiles, se produjo en el medio de M & S (1962), complementado con el 3% de sacarosa, 1,8 g/L de Phyta-Gel y 2 mg/L de BA. Posteriormente, las plántulas fueron subcultivadas en el medio M & S (1962), complementado con 3% de sacarosa sin reguladores. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Pereira y col (2008), quienes obtuvieron la germinación in vitro de *U. tomentosa* en medio WPM con 1 mg/L de BA, en tanto que el tratamiento realizado en el CIB, empleó el medio con las sales M & S (1962).

Las semillas presentan una serie de ventajas como medio de propagación; generalmente son producidas en grandes cantidades, por lo que la regeneración de las plántulas es poco onerosa; muchas pueden ser almacenadas por determinado tiempo sin que sufran pérdida de viabilidad y, en general, son de fácil manejo y distribución (George and Deberg, 2008).

Se obtuvo gran cantidad de material in vitro, el cual fue clasificado en más de 50 introducciones. En este caso, por provenir de semillas, son producto de la reproducción sexual y no son clones, lo que implica que son variables genéticas. Estas vitroplantas fueron utilizadas en los diferentes ensayos de aclimatación, callogénesis y cultivo de células en suspensión a partir de callos, caracterización genética por isoenzimas y cuantificación de cuatro oxi-indol alcaloides.

### Micropropagación

A las dos semanas del cultivo in vitro, el 88,9% de las microestacas sembradas en el medio de cultivo M & S (1962), complementado con 10 mg/l de BA, produjo un promedio de 1,55 brotes/plante; el 11,1% de las plantas no formó

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que una concentración de 0,5 mg/L de AG<sub>3</sub> indujo el crecimiento de vitroplantas de *Uncaria tomentosa*, incrementando el tamaño de las plántulas en combinación con el extracto de malta y la caseína hidrolizada.

brotos. A los quince días de la siembra, el 100% de las microestacas presentaban hojas y un promedio 2,43 brotes/planta. Las vitroplantas regeneradas mostraron gran vigorosidad. La regeneración de vitroplantas se produjo a partir de yemas preexistentes en las microestacas; probablemente, estos procesos organogenéticos fueron inducidos por diversos factores físicos y químicos, conducentes a la regeneración de *novo* (George, 2008). La respuesta favorable de los explantes probablemente fue ocasionada por la acción del BA, ya que este regulador del crecimiento promueve la división celular y controla la morfogénesis. Cuando se añade el Ba al medio de cultivo de propagación de microestacas, este inhibe la dominancia apical y promueve la ruptura de la dormancia de los brotes laterales (Staden *et ál.*, 2008).

Estos brotes de explantes fueron transferidos a un medio de cultivo M & S (1962), con menor concentración de BA (2 mg/L). La transferencia al medio de cultivo con una menor concentración de citocininas fue efectiva, probablemente, porque indujo la formación de tallos adventicios o caulogénesis, una vez que se dio la ruptura de la dormancia de brotes laterales en la fase previa con la adición de 10 mg/L de BA al medio de cultivo (Staden *et ál.*, 2008).

La micropropagación rutinaria de *U. tomentosa* se realizó sembrando microestacas con dos nudos, en un medio de cultivo con las sales de M & S (1962), 2 mg/L de BA, 3% de sacarosa y 7 g/L de agar. Debido a la presencia de hiperhibrididad en las hojas y los tallos de algunas vitroplantas, el gelificante se sustituyó por agar. El cambio de gelificante fue efectivo, ya que evitó la producción de este desorden.

Las plantas propagadas in vitro pueden resultar afectadas por varios factores que inducen la alteración metabólica y morfológica, lo que provoca la hiperhidricidad. Estudios histológicos

muestran que, generalmente, algunos tejidos están menos diferenciados de lo normal; además, según la especie, se pueden presentar alteraciones en el xilema y la corteza; algunas veces, se incrementa el número y tamaño de las células, causando hipertrofia en el parénquima, etc. (Ziv and Chen, 2008).

Posteriormente, el medio de cultivo fue modificado de la siguiente manera: a las sales del M & S (1962) se les agregó 0,5 mg/L de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), 2 mg/L de BA, 100 mg/L de caseína hidrolizada, 200 mg/L de extracto de malta, 3% de sacarosa y 7 g/L de agar; el pH se reguló a 5,7. Este medio produjo vitroplantas más vigorosas y de rápido crecimiento (Fig. 1.A).

Si bien el medio de cultivo complementado con 2 mg/L de BA indujo la formación de brotes laterales, estos crecían lentamente, por lo que el medio se modificó, añadiendo 0,5 mg/L de AG<sub>3</sub>, con el fin de estimular el crecimiento. Las giberelinas están involucradas en un amplio rango de respuestas de desarrollo que incluyen la promoción de la elongación en tallos y hojas de diversas especies (Moshkov, *et ál.*, 2008).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que una concentración de 0,5 mg/L de AG<sub>3</sub> indujo el crecimiento de vitroplantas de *Uncaria tomentosa*, incrementando el tamaño de las plántulas en combinación con el extracto de malta y la caseína hidrolizada. El extracto de malta es una fuente de carbohidratos; existen reportes que indican que ha sido efectivo en una amplia gama de procesos, por ejemplo, en la formación y multiplicación de embriones somáticos en *Citrus* y de otras especies (Thorpe *et ál.*, 2008).

En cuanto a la caseína hidrolizada (CH), esta es usada a menudo como complemento en medios de cultivo. La caseína es una proteína de la leche, fuente de calcio, fosfato, varios microelementos, vitaminas y una mezcla de 18 aminoácidos. Algunos investigadores han concluido que la CH es

más efectiva para el cultivo de tejidos que la adición de los principales aminoácidos que provee. La presencia de aminoácidos puede estimular la morfogénesis.

Existe una gran cantidad de informes citados por George y de Klerk (2008) sobre la incidencia de su empleo en la regeneración de una alta tasa de brotes adventicios y embriogénesis en peciolo de *Beta vulgaris*; concluye que aunque los aminoácidos no son componentes esenciales de los medios de cultivo, su adición, por ejemplo, como CH, es una vía económica de asegurar que el medio de cultivo no tenga deficiencias, pues la CH provee el nitrógeno como una fuente altamente disponible para el cultivo de células o tejidos (George and de Klerke, 2008).

Resultados obtenidos en este ensayo mostraron que la adición de CH al medio de cultivo desarrolló plantas vigorosas, con hojas grandes y de color verde oscuro brillante. Lo que coincide con las observaciones de Murashige & Skoog (1962), quienes informaron que la presencia de CH en el medio produjo el desarrollo de órganos vigorosos en un amplio rango de niveles de AIA y kinetina (George and de Klerke, 2008).

### Micropropagación en medio líquido

La micropropagación en jarras fermentadoras no fue efectiva en esta especie, ya que a los pocos días de la inoculación de los brotes, se observó un necrosamiento de las hojas; lo mismo ocurrió cuando las plantas se inocularon en erlenmeyers, en agitación, en medio líquido.

Uno de los principales problemas que se reportan en el uso de medio líquido, especialmente en sistemas donde los tejidos se encuentran sumergidos en el medio de cultivo, es el estrés oxidativo que se presenta en especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo se asocia con un cambio en la actividad de enzimas antioxidantes. Estos cambios pueden

afectar la anatomía, la fisiología y la sobrevivencia de las plantas (Ziv, 2005).

Las células de *U. tomentosa* cultivadas en biorreactor tipo tanque agitado, mostraron respuestas al estrés hidrodinámico y al estrés oxidativo, que hacen que esta especie sea considerada como una especie reactiva de oxígeno ROS; estos eventos se asociaron a la producción de MOA (monoterpenoides oxi-indol alcaloides) (Trejo *et ál.*, 2005).

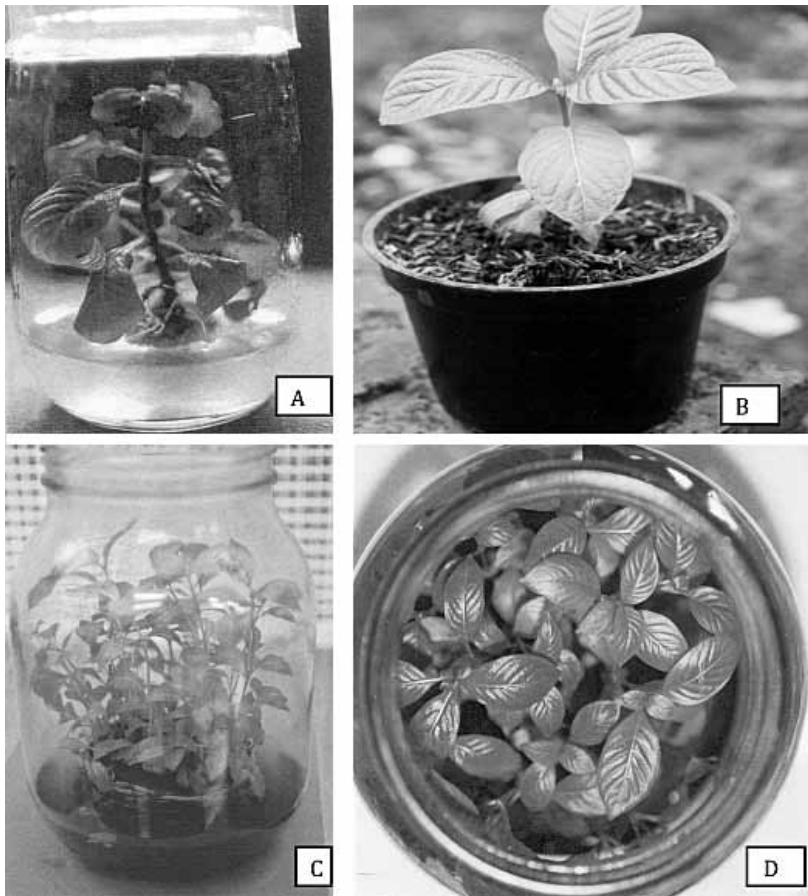
Por otra parte, con el empleo del sistema de inmersión temporal (RITA)<sup>®</sup> en el medio líquido de micropropagación (M & S (1962), con 2 mg/L de BA y 3% de sacarosa, se obtuvieron vitroplantas verdes sin necrosamiento y con una buena tasa de multiplicación en el medio de cultivo.

La ventaja del empleo de medio líquido en RITA<sup>®</sup> es el factor económico, pues es un proceso de automatización que implica ahorro en tiempo y dinero de operarios del laboratorio, puesto que pueden cultivar mayor número de explantes por contenedor, además, el medio puede ser renovado fácilmente. El sistema en cultivos líquidos provee mayor uniformidad en las condiciones de cultivo, lo que promueve un mayor crecimiento e incrementa la tasa de producción de brotes, acortando el periodo de micropropagación (Berthouly y Etienne, 2005).

La producción de raíces se inició, aproximadamente, a las dos semanas del cultivo en RITAS, en el medio de cultivo, con el 50% de las sales de M & S (1962,) 2 mg/L de la auxina ácido indol butírico (AIB), suplementado con 1% de sacarosa. Las vitroplantas se mantuvieron por un mes en este sistema y, posteriormente, se aclimataron.

### Enraizamiento y aclimatación de vitroplantas

Una vez que las vitroplantas alcanzaron un buen tamaño, fueron subcultivadas en el medio conteniendo el 50% de las sales de Murashige & Skoog (1962), suplementado



**Figura 1.** Inducción de raíces y aclimatación de vitroplantas de *U. tomentosa*. (A) Vitroplanta en medio de cultivo Murashige & Skoog (1962,) con 2 mg/L de AIB, 1% de sacarosa y 7 g/L de agar. (B) Vitroplanta a las tres semanas de aclimatada en maceta. (C) Frasco de vidrio en el que se cultivaron las vitroplantas en una capa de agua de 5 cm. (D) A las tres semanas de cultivo, las hojas presentan una cubierta de cutícula.

con las vitaminas de Morel (1958), 2 mg/L de AIB, 1% de sacarosa y 7 g/L de agar. A los pocos días del subcultivo, las plantas presentaron un callo en la base del tallo, a partir del cual se formó gran cantidad de raíces (Fig. 1.A).

La aclimatación y endurecimiento de esta especie por medio de la utilización de los métodos tradicionales, cultivando las vitroplantas en un sustrato de tierra y granza en el invernadero (Fig. 1B), el porcentaje de éxito fue menor al 5%. Probablemente, porque las plantas carecían de cutícula, rápidamente perdían agua y

morían, aunque se cubrieran con plástico. La *U. tomentosa* mostró susceptibilidad al estrés hídrico y por lo tanto, fue de difícil aclimatación.

El subcultivo de brotes y vitroplantas en el medio de enraizamiento en medio líquido, utilizando el sistema de inmersión temporal, produjo el desarrollo de un buen sistema radical y, por lo tanto, una mayor capacidad de adaptación para el endurecimiento durante la aclimatación.

El sistema de endurecimiento consistió en mantener el material vegetal inmerso en un frasco de vidrio, con un volumen de 5 cm de agua (Figs. 1C y 1D). En este sistema se consiguió un 62% de éxito en la aclimatación.

Probablemente, en estas condiciones de cultivo se originó un microclima de alta humedad relativa, en el que las vitroplantas no sufrieron estrés hídrico en el proceso de endurecimiento. A partir de la tercera semana, se observó la formación de cutícula en las hojas, lo que podría haber incidido en el éxito de la aclimatación (Fig. 1D).

Los resultados obtenidos se podrían explicar porque *Uncaria tomentosa* es una liana trepadora que se distribuye, en forma natural, en los bosques primarios de clima tropical húmedo; esta planta es conocida como “bejuco de agua” por almacenar gran cantidad de agua; en el tallo y la raíz, por lo que depende de un hábitat con alta disponibilidad de agua, se distribuye a la orilla de ríos y quebradas, y se informa que *U. tomentosa* presenta una baja tasa de regeneración natural (Jong *et ál.*, 1999).

### Agradecimientos

La autora agradece el apoyo recibido de diversas instituciones, a lo largo de varios años de investigación de esta especie, como son la Fundación Neotropical, Fundecooperación (Convenio Costa Rica-Holanda) y a la Vicerrectoría de Investigación del Instituto Tecnológico de



Costa Rica. Además, agradece su confianza a las organizaciones de agricultores AMANDES y Esperanza Verde que suministraron los materiales vegetales de *U. tomentosa* y transfirieron a sus fincas los materiales propagados in vitro. También, reconoce a la Ing. Montserrat Jarquín y a las asistentes: María Laura Madrigal, Nefertiti Chaves, Adriana Capó, Karla Salas, Laura Sánchez y Verónica Delgado, quienes, con su esfuerzo y colaboración, lograron poner a punto los protocolos descritos en este artículo.

## Conclusión

Los resultados que se muestran en este artículo constituyen la base para el desarrollo de otros protocolos indispensables para el escalamiento del cultivo de células a biorreactor. Es el primer trabajo que se realiza con genotipos de *U. tomentosa* de Costa Rica y sienta las bases para la promoción de la explotación comercial sostenible de la especie como fuente de metabolitos secundarios de interés en nuestro país.

## Bibliografía

Alvarenga, S.; Arnáez, E.; Moreira I.; Alan E.; Peraza, J.; Romero, E.; Vargas, W.; Loaiza, J.; Barrios, M. 2008. Domesticación de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) en Costa Rica. EN: *Manejo Integrado de Recursos Bióticos*. Estudios de Casos. Oliver, R.; Taboada, M. y A.E. Granejo. (Compiladores). Mexico D.F, Mexico. AGT Editor, S.A pp: 135-146.

Alvarenga, S.; Alán, E.; Peraza, J. 2002. Informe final. Estudio de la Biología, la reproducción vegetativa y cultivo *in vitro* de *Uncaria tomentosa* (uña de gato) Fundación Neotropical-ITCR. Cartago, Costa Rica. 89 pp.

Alvarenga, S.; Alán, E.; Arnáez, E.; Moreira, I.; Vargas, W.; Romero, E.; Loaiza, J.; Barrios, M. 2005. Informe final de proyecto. Plan para la promoción del conocimiento y el aprovechamiento de la *Uncaria tomentosa* (uña de gato) en dos comunidades de la región atlántica de de Costa Rica (plan piloto). ITCR-UNA. Cartago, Costa Rica. Financiado por Fundecooperación. ITCR-UNA. 321pp.

Berthouly, M and H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: a new concept. IN: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Edited by A. K Hvoslef-Eide and W. Preil. Wageningen, The Netherlands Springer. pp:165-195.

Blumenthal, M. 1995. Una de gato (Cat's claw). Rainforest herb gets scientific and industry attention. *Herbal update, Una de gato (Cat's claw)*. Whole foods magazine October 1995. P. 62, 64, 66, 68, 78. <http://www1.shore.net/~jm/claw2.html>.

Bobrowski, P. J. 2004. Methods and preparations of extracts of *uncaria* species with reduced alkaloid content. United States Patent No.: U.S 2004/0068130 A1. Apr. 8,

De Jong, W.; Melnyk, M.; Alfaro, L.; Rosales, M.; García, M. 1999. Uña de Gato: Fate Future of Peruvian Forest Resource. Center for international forestry research. Occasional paper no 22. Jakarta, Indonesia. 15pp.

Flores-Bendezu, Y. 1995. *Propagación por semilla de la uña de gato (Uncaria tomentosa)*. Lima, Perú. Instituto Nacional de Investigación Agraria. Proyecto Suelos Tropicales. Boletín Técnico 5. 31 p.

George, E. F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure-Background. IN: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Edited by E. F.; George, M. A. Hall, and G. De Klerk 3rd. Edition. Wageningen, The Netherlands Springer. pp:1-28.

George, E. F. 2008. Deberg, P. C. Micropropagation: Uses and Methods. IN: *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd. Edition Wageningen, The Netherlands. Springer. pp: 29-64.

Gupta, S.D.; Ibaraki, Y. 2006. Focus on Biotechnology: Plant Tissue Culture Engineering. Wageningen, The Netherlands. Springer. 480p.

Guri, A. 2000. PPM™ - Plant Preserve Mixture. Plant Cell Technology, Inc. Washington, D.C., USA. 13pp.

Hvoslef-Eide, A. K and W. Preil (Eds). 2005. *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*.

Keplinger, K., Laus, G., Wuem, M., Dierich, M.P. & Teppner, H. 1998. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology* 64: 23-34.

- Keplinger, K. H. Wagner, H. Kreutzkamp, B. 1989. Oxindole Alkaloids Having Properties Stimulating the Immunologic System. United States Patent #4,844,901, Jul. 4.
- Keplinger, K. H. Wagner, H. Kreutzkamp, B. 1990. *Oxindole Alkaloids Having Properties Stimulating the Immunologic System and Preparation Containing Same*. United States Patent # 4,940,725. Jul. 10.
- Murashige, T.; Skoog, G. 1962. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Pereira, R.; Valente, L.; Pinto, J; Bertolucci, S.; Bezerra, G.; Alves, F; dos Santos, P.; Benevides, P.; Siani, A.; Rosario, S.; Mazzei, J.; d'Avila, L.; Gomes, L.; Aquino-Neto F.; Emmerick, I.; Carvalhaes, S. 2008. *In vitro* cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with determination of the pentacyclic oxindole alkaloid contents and profiles. *Journal . Braz. Chem. Soc.* 19(6): 1193-1200.
- Pero, R. W. 2001. Method of preparation and composition of a water soluble extract of the plant species *uncaria* for enhancing immune, anti-inflammatory, anti-tumor and dna repair processes of warm blooded animal. United States Patent No.: U.S 2001/0022981 A1. Sep. 20.
- Obrigón, L. 1997. "Uña de Gato" "Cat's claw" *Género Uncaria*. Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. Tercera Edición. Instituto de Fitoterapia Americano. Lima, Perú. 169 pp.
- Ocampo, R.; Cifuentes, M. 1997. (eds.). *Productos no maderables del bosque en Baja Talamanca, Costa Rica*. Turrialba, C.R. Cartago, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 118 p.
- Staden, J.; Zazimalova, E.; and George E.F. 2008. *Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists*. IN: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Edited by E. F.; George, M. A. Hall, and G. De Klerk. 3rd. Edition. Wageningen, The Netherlands. Springer. pp: 205-226.
- Thorpe, T.; Stasolla, C.; Yeung, E. C.; de Klerk, G-J.; Roberts, A. and E. F. George. The Components of Plant Tissue Culture Media II: Organic Additions, Osmotic and pH Effects and Support Systems. IN: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Edited by E. F.; George, M. A. Hall, and G. De Klerk. 3rd. Edition. Wageningen, The Netherlands. Springer. pp:115-173. 2008.
- Trejo-Tapia, G., García-Rojas, C., Rodríguez-Monroy, M., Ramos-Valdivia, A. 2005. Monoterpenoid oxindole alkaloid production by *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. cell suspension culture in a stirred tank bioreactor. *Biotechnology Progress* 21: 786-792.
- Verpoorte, R.; Hoopen, H. J. G. 2006. *Plant Cell biotechnology*. IN: *Basic Biotechnology*. Third Edition. Edited by C. Ratledge and B. Kristiansen. United Kingdom Cambridge University Press pp:549-578.
- Ziv, M. and Chen, J. 2008. The Anatomy and Morphology of Tissue Cultured Plants. IN: *Plant Propagation by Tissue Culture*. Edited by E. F.; George, M. A. Hall, and G. De Klerk 3rd. Edition. Wageningen, The Netherlands. Springer. pp:465-478.
- Ziv, M. Simple bioreactors for mass propagation of plants. IN: *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. Edited by A. K Hvostlef-Eide and W. Preil. Springer. Wageningen, The Netherlands. pp:73-93. 2005.